

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN DER WHARTONSCHEN SULZE
DES 20 TAGE ALTEN RATTENFETEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Kallweit

aus Bartenstein

1971

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Whartonschen Sulze
des 20 Tage alten Rattenfeten.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den
Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Kallweit

aus Bartenstein

Referent: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Correferent: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Merker



Gedruckt: Mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 14.7.1971

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	Seite 1 - 3
II Material und Methoden	4
III Befunde	5 - 9
1. Fibroblasten	
2. Histiocytenähnliche Zellen	
3. Übergangszellen	
4. Glatte Muskelzellen	
5. Interzellulärsubstanz	
IV Diskussion	10 - 16
V Zusammenfassung	17
VI Legenden	18 - 20
VII Literaturverzeichnis	21 - 24



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548807_0008

Einleitung

Das Bindegewebe der Nabelschnur ist bisher nur von wenigen Autoren elektronenmikroskopisch untersucht worden (Moore and Schoenberg 1960, Schwarz 1961). Ein intensiveres Studium der Whartonschen Sulze dürfte jedoch für die Erforschung des Bindegewebes ganz allgemein von großem Nutzen sein, da es sich hier um ein weitgehend abgeschlossenes System handelt, das zum größten Teil aus Bindegewebe besteht, worauf definierbare mechanische Kräfte einwirken, nämlich:

- 1.) der Druck der Amnionflüssigkeit von außen,
- 2.) der Druck des Blutes in den Nabelschnurfäßen von innen und
- 3.) unregelmäßige Biegekräfte.

Diesen Biegekräften ist die Nabelschnur während der Gravidität aus räumlichen Gründen und wegen der zunehmenden Intensität der Bewegungen und Lageveränderungen des Feten in besonderem Maße ausgesetzt. Da unter normalen Bedingungen die Blutzufuhr zum Feten nicht gestört ist, muß diesen Kräften von der Whartonschen Sulze ein elastischer Widerstand entgegengesetzt werden, sonst wäre ein Abknicken der Nabelschnur mit einer Verschlechterung der Blutversorgung die Folge. Die Anordnung der Zellen, die ein dreidimensionales Netzwerk bilden, und die Zusammensetzung der Kittsubstanz, die hier einen außerordentlich hohen Gehalt an sauren Mukopolysacchariden (Hyaluronsäure) aufweist, deuten bereits in diese Richtung. Da saure Mukopolysaccharide ein hohes Wasserbindungsvermögen haben, muß die Gesamtheit der Interzellularsubstanz wie ein schlauchförmiges Wasserkissen zwischen den vasa umbilicalia und der Amnionflüssigkeit wirken. Das "Wasserkissen" wird durch die eingelagerten Bündel der Kolla-

genfibrillen und das Netzwerk der Bindegewebszellen noch erheblich stabilisiert und puffert auf diese Weise alle normalen mechanischen Belastungen erfolgreich ab. Das starke Längen- und Dickenwachstum der Nabelschnur während der Schwangerschaft wird dadurch ermöglicht, daß die Bindegewebszellen erhebliche Mengen an Interzellularsubstanz, d.h. Kollagen und Kittsubstanz produzieren. Diese zeigt sich morphologisch an der gewaltigen Vermehrung des endoplasmatischen Reticulums in den produzierenden Zellen, was bereits von Schwarz (1961) in der Nabelschnur des Menschen nachgewiesen wurde. Das morphologische Studium der Interzellularsubstanz befaßte sich bis vor kurzem noch hauptsächlich mit der Struktur der Kollagenfilamente und -fibrillen. Dabei wurde im wesentlichen ihre Synthese durch die Fibroblasten (s. Grassmann 1965, Hurich und Nordwig 1965, Schwarz 1964, 1966), ihr Abbau durch histiocytäre Elemente (Parakkal 1969, Schwarz und Güldner 1967) und die Art der Zusammenlagerung in den Bündeln (Schwarz und v. Keyserlingk, 1966, 1968) untersucht. Weiterhin wurden vergleichende Dickenmessungen der Filamente und Fibrillen in den verschiedenen Altersstufen ausgeführt (Schwarz 1956), die Zahl und Periodik der hellen und dunklen Querlinien gemessen sowie der Versilberungsmodus geprüft (Schwarz 1955). In der Kittsubstanz waren Strukturen mit den bisher zur Verfügung stehenden kontraststeigernden Mitteln OsO_4 , Uranylacetat, Bleihydroxyd) nur unbefriedigend darstellbar.

In letzter Zeit wurde jedoch das Interesse der Morphologen wieder in verstärktem Maße auf die Kittsubstanz gelenkt, nachdem die von Luft (1964, 1965) modifizierte Rutheniumrotkontrastierung in die Elektronenmikroskopie des tierischen Gewebes eingeführt wurde. Rutheniumrot ($\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_3^{6+}$) war bereits seit langem in der Botanik

als Pektinfarbstoff in Gebrauch. Erst später erkannte man, daß sich die Substanz ebenfalls für die Anfärbung und Fixierung saurer Mukopolysaccharide eignet (Luft 1964, 1965, 1966).

Seitdem wurden zahlreiche Gewebe, in denen die Mukopolysaccharide von besonderem Interesse sind, mit dieser Methode untersucht, wie z.B. die Matrix des hyalinen Knorpels, die "cementing substance" an Kollagenfibrillen im Diaphragma und die mucösen Hüllen der Darmepithelien (Luft 1965). Highton et al (1968) und Myers et al. (1969) modifizierten Lufts Methode und untersuchten die Synovia des Menschen und verschiedener Tiere. Mit Hilfe dieser Methode färben sich die betreffenden Areale je nach Vorkommen und Anordnung der Mukopolysaccharide sehr unterschiedlich an. Es erscheinen amorphe Rutheniumrot-positive Hüllen um die Kollagenfibrillen oder an Zellmembranen (Glycocalyx), elektronendichte Plaques oder filamentäre, bzw. fibrilläre Strukturen. Vorbehandlung mit Hyaluronidase und Papain verhindert oder vermindert wiederum das Auftreten dieser gefärbten Strukturen, was einerseits die Affinität des Rutheniumrots zu den Mukopolysacchariden, andererseits das Vorkommen bestimmter Mukosubstanzen an definierten Orten aufdeckt, wie z.B. der Hyaluronsäure.

Es erscheint demnach vielversprechend, die Rutheniumrot-Färbung auch am Bindegewebe der Nabelschnur anzuwenden, zumal es aufschlußreich sein könnte, die Beziehungen zwischen Mukopolysacchariden und Kollagen anhand von relativ unreifem Kollagen mit den Verhältnissen bei reiferen Stadien zu vergleichen.

Material und Methoden

Nabelschnüre von 20 Tage alten Rattenfeten (Wistar-ratten) wurden folgendermaßen fixiert:

- 1.) In Karnovski-Lösung (3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in 2/10 m Natriumcacodylatpuffer mit Zusatz von 50 mg CaCl_2 auf 100 ml) bei einem pH von 7,4 und 4 Grad C für 1 Std. Darauf erfolgte das Auswaschen der Gewebsstücke in 2/10 m Na-Cacodylatpuffer und eine 1-stündige Nachfixierung in 1%igem OsO_4 in 2/10 m Na-Cacodylatpuffer.
- 2.) Nach der Methode von Luft (1964) modifiziert von Highton et al. (s. Myers et al. 1969), wonach das Gewebe in 1,2%igem Glutaraldehyd in 0,1 m Na-Cacodylatpuffer und 1500 ppm Rutheniumrot bei einem pH von 7,4 und 4 Grad C 1 Std. fixiert wurde. Das Gewebe wurde dann für 20 min. in 0,1 m Na-Cacodylatpuffer (enthaltend 800 ppm Rutheniumrot, pH 7,4) gespült und in einer Lösung von 2% OsO_4 in 0,05 m Na-Cacodylatpuffer und 400 ppm Rutheniumrot (pH 7,4) nachfixiert.

Die Entwässerung geschah für beide Fixierungsmethoden in gleicher Weise: Nach kurzer Spülung in Pufferlösung wurden die Gewebsstücke in die Acetonreihe überführt und in Mikropal (Firma Ferak, Berlin) eingebettet. Zur Orientierung dienten 1-2 μ dicke Schnitte, die am Porter-Blum Mikrotom gefertigten Dünnschnitte (ca. 500-700 Å dick) wurden auf Netz- und Großlochblenden gezogen und mit Uranylacetat (gesättigte alkoholische Lösung) und Bleihydroxyd kontrastiert. Die Schnitte der mit Rutheniumrot behandelten Gewebsstücke blieben teilweise unkontrastiert. Die Bilder wurden auf Hartplatten der Firma Gevaert/Agfa im Siemens-Elmiskop I bei einer Strahlungsspannung von 80 kV aufgenommen. Die Vergrößerung erfolgte 3,5 mal auf Papiere mit verschiedener Gradation.

Befunde

Die Whartonsche Sulze der Nabelschnur des 20 Tage alten Rattenfeten besteht aus einem weitmaschigen Netzwerk von Fibroblasten, histiocytenähnlichen Zellen, "Übergangszellen" und glatten Muskelzellen. Die Maschen dieses Netzes werden von einer Interzellulärschubstanz ausgefüllt, die sich ihrerseits aus Reticulinfibrillen und einer Kittsubstanz zusammensetzt.

Fibroblasten: Obwohl die typisch spindelige Gestalt der Fibroblasten im wesentlichen gewahrt bleibt, sind diese Zellen hier sehr unregelmäßig konturiert. Die Oberfläche ist im Bereich des Perikaryons mehr oder weniger stark gebuchtet. Von dort aus sendet die Zelle über weite Strecken schmale, blattförmige Ausläufer entsprechend ihrer Polarität in hauptsächlich zwei, einander entgegengesetzte Richtungen. Die Ausläufer sind streckenweise so schmal, daß sich keine Organellen mehr in ihnen aufhalten können; sie werden jedoch in ihrem teils geraden teils welligen Verlauf von dickeren, organellenhaltigen "Varicositäten" unterbrochen. Oft zweigen von diesen Auftreibungen, den Ausläufern oder den Perikarya weitere dünne Ausläufer in spitzem Winkel ab. (Abb. 1)

Auch die länglichen Kerne sind durch zahlreiche Einbuchtungen sehr unregelmäßig gestaltet. Das Chromatin ist am Rande elektronendicht, im Innern weit heller; hier liegt vor allem körnig-flockiges Material, das sich an vielen Stellen zu dichteren Aggregaten gruppiert. Die Zahl der zum Cristae-Typ gehörigen Mitochondrien ist verhältnismäßig gering. Sie liegen in kleinen Ansammlungen im Perikaryon und den Varicositäten. Ihre Größe beträgt durchschnittlich 2µm. Auffällig ist das zahlreiche Vorkommen des endoplasmatischen Reticulums (ER) in den Perikarya und den Auftreibungen der Zellausläufer. Dabei sind zwei Formen zu unterscheiden: Den ersten Typ bilden labyrinthartige verzweigte, oft erheblich aufgeblähte, membranum-

geschlossene Hohlräume, die das Cytoplasma häufig auf kleine Bezirke zusammendrängen. Die Membranen haben einen dichten Ribosomenbesatz, wodurch diese Form als das sogenannte "rauhe endoplasmatische Reticulum" (ERr) gekennzeichnet ist. Der Inhalt des ERr besteht aus einer elektronenhellen Substanz, in der flockiges, feinfilamentäres Material beobachtet werden kann (Abb. 1,2,3a).

Den zweiten Typ repräsentieren Vesikel und Vakuolen ($\varnothing$ 50-700 nm), deren Membran gewöhnlich nicht von Ribosomen besetzt ist, die also zum "glatten endoplasmatischen Reticulum" gehören (ERs). Die Vakuolen sind elektronenoptisch zumeist leer, haben aber zuweilen einen dichten, feinkörnigen Inhalt, der nur einen Teil des Volumens der Vakuolen ausfüllt. Die Fibroblasten enthalten vornehmlich ERr. Sowohl die Zisternen des ERr als auch die Vakuolen des ERs kommen der Zellmembran vielfach sehr nahe, an einigen Stellen lassen sich die Membranen des ER und der Zelle optisch nicht mehr voneinander trennen (Abb. 3). An diesen Stellen fehlen an der Membran des ERr auch die Ribosomen. Eine offene Verbindung des ER-Lumens mit dem extrazellulären Raum (EZR) konnte jedoch bisher noch nicht mit letzter Gewißheit festgestellt werden (Abb.2).

Gelegentlich findet man weit in den EZR hinausgestülpte Vakuolen vgl. (Abb. 6b). Sie gleichen einerseits den bereits beschriebenen Vakuolen des ERs, andererseits den blasenförmigen Gebilden, die zahlreich in unmittelbarer Nähe der Fibroblasten, teilweise sogar in den Einbuchtungen der Zellmembranen anzutreffen sind (Abb. 1,3a).

Freie Ribosomen ($\varnothing \approx 150 \text{ \AA}$) kommen vor, sind jedoch nicht häufig. Auffällig sind größere Mengen von Glycogengranula, die sich von den freien Ribosomen durch die etwas höhere Elektronendichte und den größeren Durchmesser ($\varnothing \geq 200 \text{ \AA}$) unterscheiden. Hin und wieder findet man elektronenhelle

Stellen im Cytoplasma, an deren Peripherie Glycogen-granula gehäuft vorkommen. Der Golgi-Apparat ist in der Menge der Zisternen, Vakuolen und Vesikel des ERs nur schwer zu erkennen. Lysosomen finden sich selten. Unterhalb der Zellmembran verlaufen oft Bündel ca. 30-70 Å dicker Filamente.

Die Zellfortsätze der Fibroblasten sind mit den Ausläufern der Nachbarzellen durch bestimmte Kontakte, sogenannte "maculae occludentes" miteinander verbunden. Hierbei sind die äußeren Membranlamellen der beteiligten Zellen eine kleine Strecke entlang (ca. 150 nm) miteinander verschmolzen, sodaß ein 5-schichtiger Membrankomplex mit einem Durchmesser von etwa 150 Å resultiert (vgl. Abb. 6a). An der äußeren Oberfläche der Zellmembran sind diskontinuierlich flockige und feinfilamentäre Substanzen angelagert.

Histiocytenähnliche Zellen: Diese Zellen ähneln den Fibroblasten in fast allen beschriebenen Punkten. Der einzige Unterschied besteht im Grunde darin, daß hier die Vakuolen des ERs die Schläuche des ERr an Zahl weit übertreffen (Abb. 1,4,5,6). Auch die Fortsätze dieser Zellen sind durch "maculae occludentes" miteinander verbunden (Abb. 6a).

Übergangszellen: Verschiedentlich trifft man bei der Untersuchung der Whartonschen Sulze auf Zellen, die den Fibroblasten ebenfalls sehr ähnlich sind, sich aber in einigen Punkten von ihnen unterscheiden: Die unter der Zellmembran liegenden Filamentzüge sind bei ihnen verstärkt, das ER tritt mehr und mehr zurück, Zisternen sind nur noch selten, die Elektronendichte des Cytoplasmas nimmt zu, ebenso der Glycogengehalt. Auch das der Zellmembran - wenn auch meist noch diskontinuierlich-aufliegende flockig-filamentöse Material ist vermehrt. Die Zellmembran erscheint weniger gebuchtet (Abb. 7).

Glatte Muskelzellen: Locker um die Nabelschnurgefäße gruppiert liegen glatte Muskelzellen, zum großen Teil noch inmitten der Bindegewebszellen. Mit einer Ausnahme zeigen sie das gewohnte Bild: Spindelförmige Gestalt, weit-

gehend kontinuierliche Basalmembran; starke periphere Filamentzüge schließen den zentral gelegenen Kern und das Cytoplasma ein, das wohlausgebildete Schläuche des ERr, Mitochondrien, Vesikel, Golgi-Apparat und Glycogengranula enthält. Dicht unter der Zellmembran sind häufig Vesikel zu beobachten.

Die Glycogengranula sind hier jedoch zu noch größeren Haufen aggregiert, aus denen manchmal das Glycogen während der Entwässerung hinausdiffundiert ist, so daß weite Hohlräume mit restlichen peripheren Glycogenansammlungen entstehen (Abb. 8).

Interzellulärsubstanz: Die Retikulinfibrillen sind meist zu größeren Bündeln vereinigt, nur wenige liegen einzeln in der Interzellulärsubstanz, Die Bündel durchziehen in weiten Kurven und Schwüngen den EZR (Abb. 1, 4, 7). Die Abstände der benachbarten Fibrillen schwanken zwischen 200 und 1100 Å. Anhand von Längsschnitten gewinnt man den Eindruck, daß die Fibrillen untereinander verdreht verlaufen. Ihre Dicke schwankt zwischen 230 und 500 Å mit einem Maximum bei 340 Å (Abb. 9). Auf Längsschnitten sind dunkle und helle Querlinien deutlich zu unterscheiden; der Abstand zwischen den dunklen Haupt-Querlinien beträgt durchschnittlich 520 Å. Innerhalb der Fibrillenbündel ist der Raum zwischen den Fibrillen- die Kittsubstanz- von undeutlichen filamentären Strukturen und einem amorphen Material geringer Elektronendichte gefüllt. In den mit Rutheniumrot behandelten Gewebeproben dagegen erscheinen in der Kittsubstanz selektiv gefärbte Strukturen:

- 1.) Von jeder Fibrille ziehen stark angefärbte "Brücken" zur Nachbarfibrille. Anhand hoher Vergrößerungen ist zu erkennen, daß die Brücken an den dunklen Haupt-Querlinien (Hauptbanden) der Fibrillen ansetzen, bzw. entspringen (Abb. 3b, c, 6b). Ihre Entfernung voneinander ist demnach gleich der Periodik der Hauptbanden (ca 530 Å). Die Dicke dieser Brücken beträgt etwa 80-120 Å, ihre Länge rund 550 Å. Sie entspricht nicht

immer dem mittleren Abstand der Fibrillen untereinander, da die Fibrillen oft in ihrer Längsachse gegeneinander verschoben sind, wodurch der Winkel zwischen Fibrillen und Brücken wechseln kann und nicht etwa immer 90 Grad beträgt.

- 2.) Von den Fibrillen können auch weit längere filamentäre Strukturen (50-60 Å dick) entspringen. Sie sind besonders deutlich an einzelnen in der IZs oder an der Peripherie der Bündel liegenden Fibrillen zu sehen (Abb. 3c).
- 3.) Auch die übrigen Anteile der die Fibrillen umhüllenden Kittsubstanz erscheinen durch Rutheniumrot etwas stärker angefärbt als in den Kontrollen. Neben den Retikulinfibrillen finden sich weit weniger häufig Aggregationen von Filamenten (120-140 Å) in der Interzellulärsubstanz.

Diskussion

Die Interzellulärsubstanz der Whartonschen Sulze ist durch einen hohen Gehalt an Kollagen und besonders an Mukopolysacchariden gekennzeichnet, die mit ihren starken Wasserbindungsvermögen den gallertartigen Charakter dieses Gewebes begründen. Zur Bildung dieser Substanzen ist das ERr der Fibroblasten befähigt. Die gewaltige Produktionsleistung der Zellen, die das schnelle Dicken- und Längenwachstum der Nabelschnur ermöglicht, ist deutlich an den oft exzessiv erweiterten Zisternen des ERr abzumessen, die vielfach den größten Teil des Zellvolumens beanspruchen. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich mit dem ER von in vitro gezüchteten Fibroblasten, das sich nie in derartiger Form erweitert (Schwarz et al. 1961), obwohl auch diese Zellen weiterhin zur Kollagensynthese fähig sind. Das Ausmaß der Produktionsleistung der sezernierenden Zellen, d.h. die Produktionsarbeit pro Zeiteinheit, muß also von Faktoren abhängen, die weder der Zelle noch etwa den Kulturmedien innewohnen, sondern im lebenden Organismus auf die produzierenden Zellen von außen her regelnd einwirken.

Es besteht noch keine völlige Klarheit über die Frage in welcher Form das Kollagen von den Fibroblasten entlassen wird: Ob als Polypeptid, als Tropokollagen, das als Baustein der zukünftigen Fibrille aus drei in einer α -Helix verschraubten Polypeptidketten besteht oder als noch größere Einheit. Dasselbe gilt für die Art der Ausschleusung der synthetisierten Substanzen. Vermutet wird, daß sich die Schläuche und Zisternen des ERr an die Zellmembran anlagern und ihren Inhalt durch die Verschmelzung der Membranen nach außen in den EZR abgeben (Karrer 1960, Merker 1961, Schwarz 1960, Sheldon 1960). Andere Autoren vertreten dagegen die Ansicht, daß sich die feinfilamentären Vorstufen der

Fibrillen unter der Zellmembran ansammeln und sie durchwandern (Chapman 1961, Yardley et al. 1960, Blümcke et al. 1969). Eine weitere Möglichkeit wurde von Karrer (1960) erwogen, der extrazellulär gelegene vesikuläre Strukturen für in toto abgestoßene Teile des ER hielt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Befunde begünstigen die erste und die letzte der beschriebenen Möglichkeiten. Hin und wieder kommen nämlich die Membranen des ER der Zellmembran derart nahe, daß sich zwischen ihnen kein elektronenoptisch wahrnehmbarer Zwischenraum mehr befindet; an den Membranabschnitten des ER, die an der "Fusion" teilnehmen, fehlen auch die Ribosomen. An einer Stelle erscheint die Verschmelzung der beiden Membranen und somit die Kommunikation des Zisternenraums mit dem EZR bereits vollzogen (Abb.2). Das in der "Öffnung" liegende homogene Material läßt sich jedoch von tangential angeschnittenen ("umgekippten") Zellmembrananteilen nicht eindeutig genug unterscheiden, so daß letzte Zweifel noch nicht ausgeräumt werden können, ob hier tatsächlich eine echte Kommunikation vorliegt. Allerdings ist es unwahrscheinlich, daß mit den augenblicklich üblichen Fixierungsmethoden derartige Membranvorgänge befriedigend dargestellt werden können, da sie noch während der Fixierung zu Ende abzulaufen scheinen. Obwohl Glutaraldehyd relativ schnell in Gewebestück eindringt, erlaubt es dennoch für eine gewisse Zeit die Abwicklung zahlreicher chemischer und chemisch-physikalischer Vorgänge in den Zellen, auf Grund dessen z.B. histochemische Nachweisreaktionen für die Elektronenmikroskopie ermöglicht werden. OsO_4 penetriert sehr viel langsamer als Glutaraldehyd, läßt also allein aus diesem Grund dem Gewebe noch großen zeitlichen Spielraum für strukturelle Veränderungen. Erst die Vervollkommnung von Gefriertrocknungsverfahren wird es ermöglichen, Präparate mit sofort nach Fixierungsbeginn

stabilisierten Strukturen zu erhalten.

Das von der Zelle ausgestoßene Material legt sich zunächst von außen an die Zellmembran an (marginale Kondensation). Dies konnte auch an den Nabelschnur-fibroblasten dargestellt werden; das zuerst noch filamentär-flockige Material lagert sich wohl auch unter Einfluß der Kittsubstanz zu höheren Aggregationsstufen, Filamenten und schließlich den quergestreiften Fibrillen zusammen. Da die histiocyten-ähnlichen Zellen den Fibroblasten in fast allen Punkten gleichen, liegt eine enge Verwandtschaft zwischen beiden Zelltypen nahe. Es scheint, daß hier während der Entwicklung und des Wachstums der Nabelschnur sich bestimmte Zellen im Verband der Fibroblasten für gewisse Aufgaben spezialisieren. Vielleicht werden auf diese Weise die Fibroblasten funktionell entlastet, so daß sie sich ihrer Hauptaufgabe, der Kollagensynthese, nunmehr verstärkt widmen können. Immerhin findet man in ihnen noch oft eine kleine Anzahl von Vakuolen des ERs, zum Teil mit dem gleichen elektronendichten Inhalt wie der in den Vakuolen der histiocytenähnlichen Zellen, was dafür spricht, daß die von diesen Zellen übernommene Funktion auch in den Fibroblasten in geringem Maß aufrecht erhalten wird. Diese noch völlig unbekannte Funktion der histiocytenähnlichen Zellen könnte darin bestehen, andere Bestandteile des Bindegewebes der Nabelschnur (Mukopolysaccharide) zu produzieren. Die provisorische Benennung "Histiocyten-ähnliche Zelle" suggeriert jedoch ungewollt die Möglichkeit einer phagocytotischen Aktivität, die - obwohl typische Lysosomen fehlen - noch nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Die Bedeutung der maculae occludentes, welche die Fortsätze benachbarter Fibroblasten und "Histiocyten" miteinander verbinden, bleibt in diesem Gewebe noch unklar. Es scheint sicher, daß sie nicht etwa nur

mechanische Haftfunktionen erfüllen. Nach Löwenstein und Kanno (1964) ermöglichen sie freien Austausch von Ionen und anderen Stoffen zwischen den beteiligten Zellen. Eventuell dienen sie dazu, bestimmte Funktionen bei allen Zellen des Gewebes zeitlich und quantitativ gleichzuschalten. Eine andere Theorie vertritt die Vorstellung, daß es sich hier um elektrotonische Kontaktstellen handelt, welche eine Depolarisation auf die Nachbarzelle weiterleiten, wie zum Beispiel die "elektrischen Synapsen" in bestimmten Gebieten des ZNS (Brightman and Reese 1969, Sotelo und Taxi 1970) und die Nexus der glatten Muskelzellen. Die Kenntnis über die Feinstruktur der maculae occludentes, jetzt auch als "gap junctions" bezeichnet, wurde in letzter Zeit von McNuff und Weinstein (1970) mit Hilfe der Gefrierätzmethode wesentlich erweitert.

Auf Querschnitten erscheinen die Fibrillen innerhalb der Bündel auf den ersten Blick so regelmäßig gruppiert, daß der Verdacht auf eine kristalline Anordnung aufkommt. Genauere Messungen ergaben jedoch, daß die Abstände der benachbarten Fibrillen unterschiedlich sind, so daß von einer hexagonalen Anordnung nicht gesprochen werden kann. In Anlehnung an Langham et al. (1969) sollte also hier von einer "quasi-regulären, quasi-zufälligen" Anordnung gesprochen werden.

Die Dicke der Kollagenfibrillen in der Interzellularsubstanz schwankt zwischen 240 und 440 Å, mit einem Maximum bei 340 Å. Schwarz (1961) fand in der Nabelschnur des menschlichen Fetus im 4. Monat eine Fibrillendicke von 200-280 Å und nach der Geburt eine solche von durchschnittlich 380 Å. Obwohl vergleichende Untersuchungen noch fehlen, ist aus den vorliegenden Zahlen zu erwarten, daß die Fibrillendicken in den verschiedenen Fetalstadien bei der Ratte denen des Menschen annähernd entsprechen.

Die Affinität saurer Mukopolysaccharide zum Kollagen wurde bereits seit langem als wichtige Voraussetzung für den Aufbau und die Erhaltung von Struktur und

Funktion des Bindegewebes angesehen (Merker 1971). Die Mukopolysaccharide, unter denen mengenmäßig besonders Hyaluronsäure und Chondroitinsulfate hervorragen, werden mit Hilfe der Rutheniumkontrastierung selektiv angefärbt. Ihre enge Assoziation mit den Kollagenfibrillen wurde bereits von mehreren Autoren mit dieser Methode nachgewiesen (Luft 1965, 1966; Myers et al. 1969). Myers et al. fanden in der menschlichen Synovia folgende Rutheniumrot-positive Strukturen:

- 1.) Amorphe elektronendichte Umhüllungen der Fibrillen, die weitgehend aus Chondroitinsulfat bestehen ("amorphous coats").
- 2.) Transversale "Gürtel" um die Hauptbänder ("transverse belts"), die sich wahrscheinlich aus einer Mischung von Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure zusammensetzen.
- 3.) Feine laterale Filamente, die von den dunklen Hauptbändern ausgehen und zum Teil mit beträchtlicher Länge in die umgebende Kittsubstanz hineinragen, zum Teil an den Hauptbändern von Nachbarfibrillen anzusetzen scheinen und aus ähnlichen Substanzen wie die "transversal belts" aufgebaut sind.
- 4.) Zwischengelagerte Filamente die nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase nicht auftreten und folglich hauptsächlich aus Hyaluronsäure bestehen.

Vergleicht man diese Resultate mit den hier vorliegenden Befunden, so ist festzustellen, daß in der Nabelschnur

- 1.) die Fibrillen nicht einzeln von einer dünnen elektronendichten Hülle bedeckt sind, sondern insgesamt in einer schwach Rutheniumrot-positiven Substanz eingebettet liegen.

- 2.) "Transverse belts" in dem beschriebenen Ausmaß nicht vorhanden sind.
- 3.) ebenfalls von den dunklen Hauptlinien laterale Filamente ausgehen, die jedoch um einiges dicker und kürzer als die "fine lateral filaments" sind und deutlich an den entsprechenden dunklen Hauptlinien der Nachbarfibrillen ansetzen, was sowohl auf Längs- wie auch auf Querschnitten deutlich wurde. Strukturen, die den von Myers et al. beschriebenen "fine lateral filaments" weit ähnlicher sahen, wurden mehr am Rade der Fibrillenbündel gesehen. Es handelt sich hierbei um lange, sehr dünne Filamente, die weit in den die Fibrillenbündel umgebenden Raum hineinverlaufen.
- 4.) "Intermediäre Filamente" wurden nicht beobachtet.

Analog zu den Befunden von Myers et al. kann erwartet werden, daß sich die Rutheniumrotpositiven Substanzen in der Nabelschnur ebenfalls aus den wichtigsten Mukopolysacchariden wie Hyaluronaten und Chondroitinsulfaten zusammensetzen, noch zusätzlich gekoppelt mit Proteinen (Mukopolysaccharid-Protein-Komplexe). Auffällig ist die Affinität bestimmter Mukopolysaccharide zu den dunklen Hauptlinien. Die Gruppen der Tropokollagenmoleküle, welche diese Hauptlinien bilden, müssen sich demnach mit den Mukopolysaccharid-Protein-Komplexen selektiv verbinden.

Die Entstehungsmechanismen dieses relativ komplizierten Gitterwerks aus longitudinalen Skleroproteiden und transversal angeordneten Mukoproteiden im freien interzellulären Raum sind noch weitgehend ungeklärt. Sicher scheint jedenfalls, daß sich die von den Fibroblasten in den IZR entlassenen Vorstufen des Kollagens erst unter dem Einfluß der Mukopolysaccharide zu höheren Aggregationsstufen zusammenfügen (Lowther 1968).

An manchen Stellen trifft man auf Zellen, die den Fibroblasten zwar in vielem gleichen, aber weitaus stärkere marginale Filamentansammlungen aufweisen. Auch sind die Schläuche des ERr nicht mehr nennenswert erweitert. Derartige Zellen, die nicht mehr Fibroblast und noch nicht glatte Muskelzelle sind, findet man auch an terminalen Arteriolen (Hammersen 1970) und im Stroma der Darmzotten (Güldner und Wolff 1970). Diese Befunde könnten bedeuten, daß

- 1.) eine nahe Verwandtschaft zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen besteht.
- 2.) bei bestimmten, lokal zunehmenden mechanischen Belastungen sich die ausdifferenzierten glatten Muskelzellen auch während der Fetalzeit nicht mehr teilen, sondern nur noch hypertrophieren, bzw. einen zahlenmäßigen Zuwachs nur aus dem Reservoir mesenchymatischer Zellen (hier Fibroblasten) erhalten können.
- 3.) ganz allgemein- Je nach mechanischer Beanspruchung- die Differenzierungsvorgänge auf verschiedenen Stufen stehen bleiben können.

Zusammenfassung:

Die Whartonsche Sulze der Nabelschnur des 20 Tage alten Rattenfeten wurde 1.) unbehandelt und 2.) nach Behandlung mit Rutheniumrot elektronenmikroskopisch untersucht. Folgende Zellarten kommen vor: 1.) Fibroblasten, 2.) Histiocytenähnliche Zellen, 3.) "Übergangszellen", 4.) Glatte Muskelzellen.

In der Interzellulärsubstanz liegen Bündel durchschnittlich 340 Å dicker Fibrillen. Nach Behandlung mit Rutheniumrot erscheinen in der Kittsubstanz a) 90-120 Å dicke "Brücken", welche - an dunklen Hauptbändern ansetzend - benachbarte Fibrillen innerhalb der Bündel miteinander verbinden. b) längere dünne Filamente an einzelnen in der Interzellulärsubstanz oder an der Peripherie der Bündel liegenden Fibrillen und c) diffus gefärbte Areale verschiedener Ausdehnung innerhalb und außerhalb der Fibrillenbündel.

Dieses Resultat wird den an reifen Kollagen in der Synovia mit der gleichen Methode erhobenen Befunden gegenübergestellt.

Die möglichen Mechanismen der Kollagenausschleusung aus den Fibroblasten werden erwogen; dabei erscheint die Verschmelzung der Membran des rauhen endoplasmatischen Reticulums mit der Zellmembran mit darauffolgender Abgabe der Kollagenvorstufen nach außen am meisten wahrscheinlich.

Die Verwandtschaft der Übergangszellen mit den Fibroblasten, bzw. ihre Eigenschaft als Übergangsstadium zwischen Fibroblast und glatter Muskelzelle werden diskutiert.

Die Funktion der "Histiocytenähnlichen Zellen" bleibt unklar.

Legenden

Abb. 1 Verband parallel angeordneter Fibroblasten (F) und histiocytenähnlicher Zellen, bzw. deren Ausläufern (H) mit streckenweise perlschnurartiger Folge von sehr dünnen Anteilen und Varicositäten. K= Kollagenfibrillen, ↗ =rauhes endoplasmatisches Reticulum, ♂ = Vakuolen des glatten ER. 0 = Kontaktzone, x= extrazelluläre-vakuoläre Gebilde zwischen zwei histiocytenähnlichen Zellen.
Vergr.: 7000

Abb. 2 Teil eines Fibroblasten. Bei x scheint das Innere der Zisterne des ERr mit dem extracellulären Raum zu kommunizieren. ERr= rauhes endoplasmatisches Reticulum, F= Filamente, G= Glycogengranula, ♂ = Vesikel des glatten ER.
Vergr.: 84 000

Abb. 3

- a) Perikaryon eines Fibroblasten. ERr=Zisternen des rauhes ER, G=Glycogengranula, N=Nucleus, V=Vesikel des glatten ER, ↗ = Verschmelzungszone der Membranen des ERr und der Zelle, x=Areal, aus dem Glycogen während der Entwässerung heraus gelöst wurde. ↗↗blasenartiges extrazellulär liegendes Gebilde.
Vergr.: 25 000
- b) Bündel längsgeschnittener Kollagenfibrillen, die leiterartig von querverlaufenden Rutheniumrot-positiven "Brücken" verbunden sind. Die "Brücken" entspringen von den dunklen Hauptbänden= 0
Vergr.: 91 000

- c) Bündel quergeschnittener Fibrillen. $\uparrow$ = Rutheniumrot-positive "Brücke" zwischen benachbarten Fibrillen, $\uparrow$ = dünnes, an einer peripheren Fibrille ansetzendes Rutheniumrot-positives Filament. Zwischen den Fibrillen und im Interzellularraum liegt stellenweise amorphes oder flockig-körniges Material, ebenfalls leicht Rr-positiv (x)
Vergr.: 70 000

Abb. 4 Verband histiocytenähnlicher Zellen (H). Die parallel angeordneten, polaren Zellen werden durch recht- und spitzwinklig abgehende Fortsätze (x) quervernetzt. $\uparrow$ Vakuolen des glatten ER, zum Teil mit elektronendichtem Inhalt, M= Mitochondrien
Vergr.: 7000

Abb. 5 Histiocytenähnliche Zelle. V=Vakuolen des glatten ER, hin und wieder mit einem elektronendichten Inhalt, der die Vakuole nur zum Teil ausfüllt. F=Fibroblast, K=Kollagenfibrillen, M=Mitochondrien, N=Nucleus
Vergr.: 35 000

Abb. 6
a) Maculae occludentes zwischen den Fortsätzen histiocytenähnlicher Zellen ($\uparrow$). V=Vakuolen des glatten ER, G=Glycogengranula
Vergr.: 56 000

b) Teil einer histiocytenähnlichen Zelle. V=Vakuolen des glatten ER, X=vakuoläres Gebilde im extrazellulären Raum, K=Kollagenfibrillen, $\uparrow$ blasenartige Vorstülpung einer Vakuole in den extrazellulären Raum
Vergr.: 91 000

Abb. 7 Übergangszellen mit zurückgebildetem ERr ($\uparrow$) mit stärkeren Filamentanhäufungen (x) und

streckenweise noch fehlender Basalmembran. M=Mitochondrien

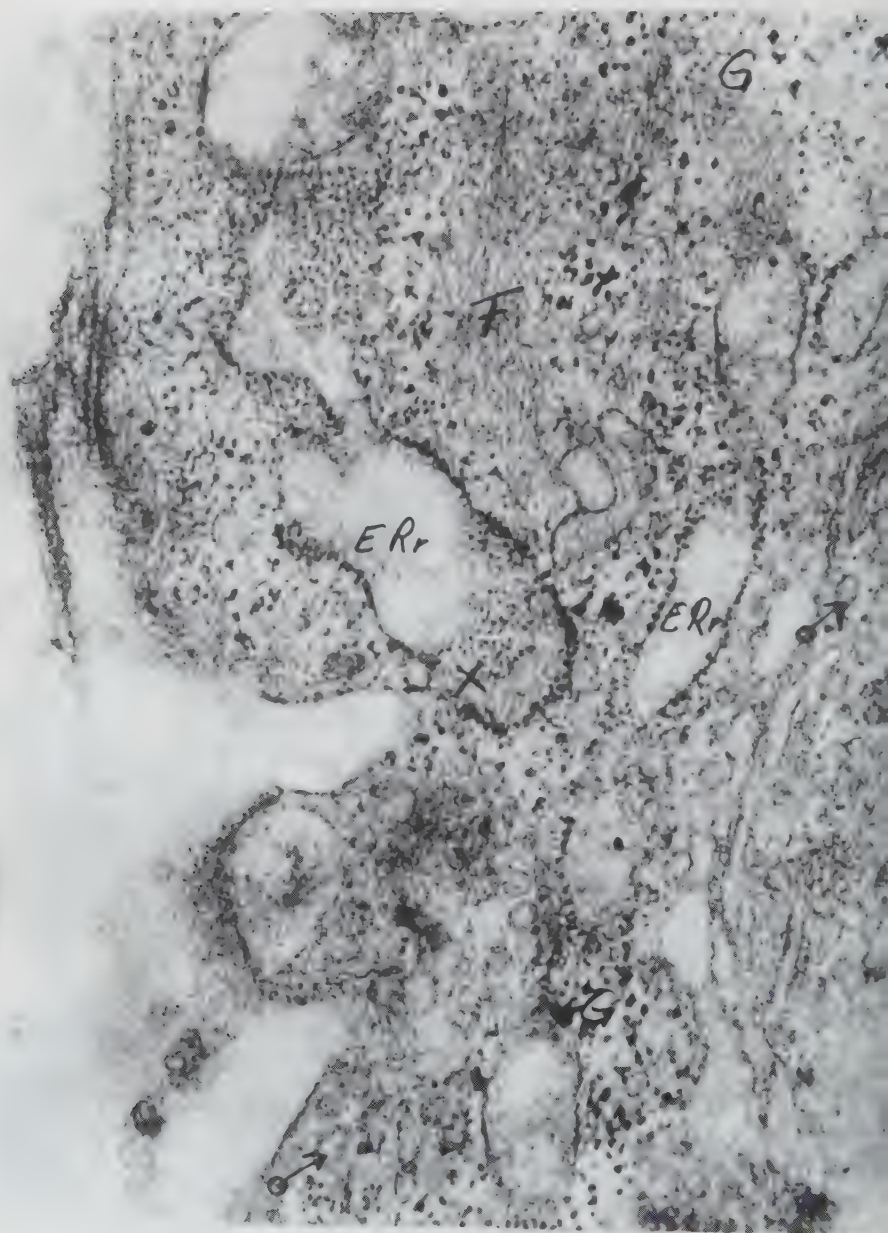
Vergr.: 14 000

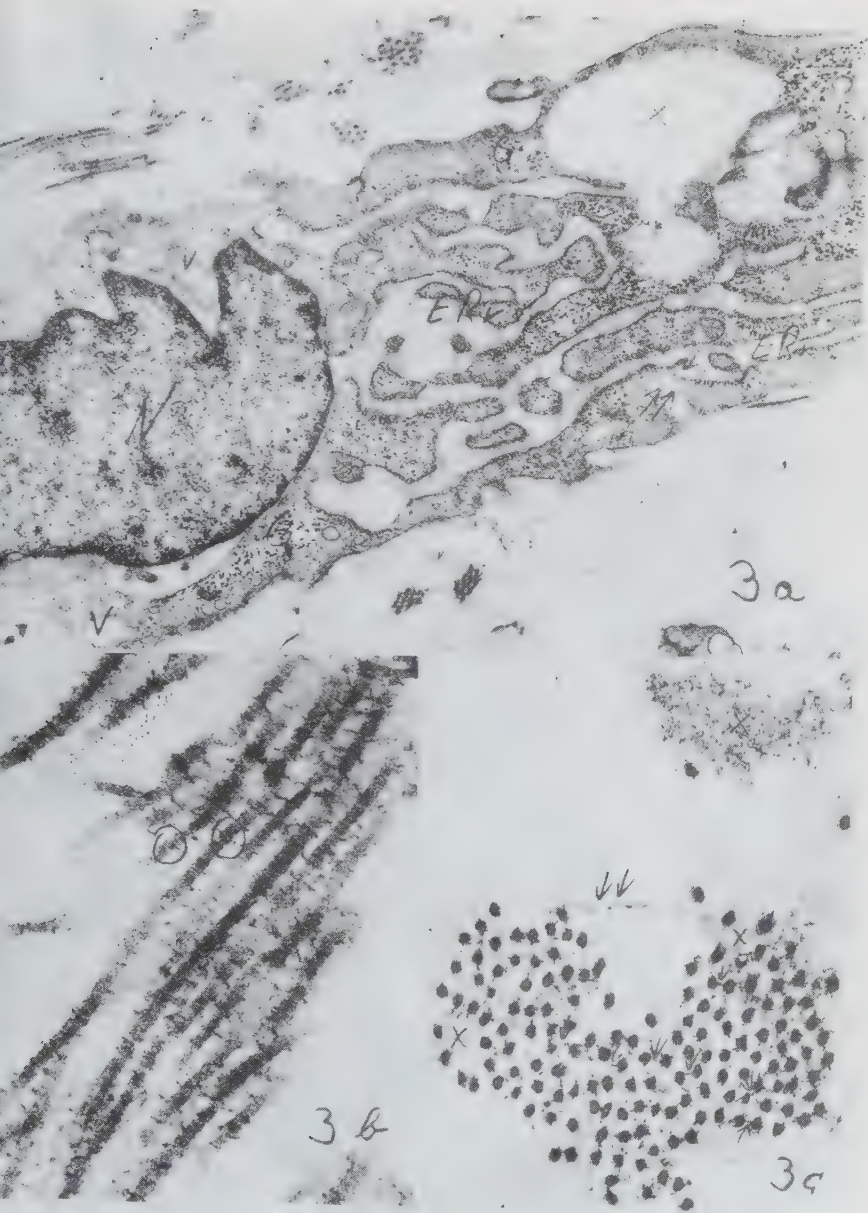
Abb.8 Glatte Muskelzelle mit starken Glycogenanhäufungen (G), die zum Teil herausgelöst sind (x). Beachte die kontinuierliche Basalmembran. F=Filamente, GA=Golgiapparat, $\nearrow$: rauhes ER.

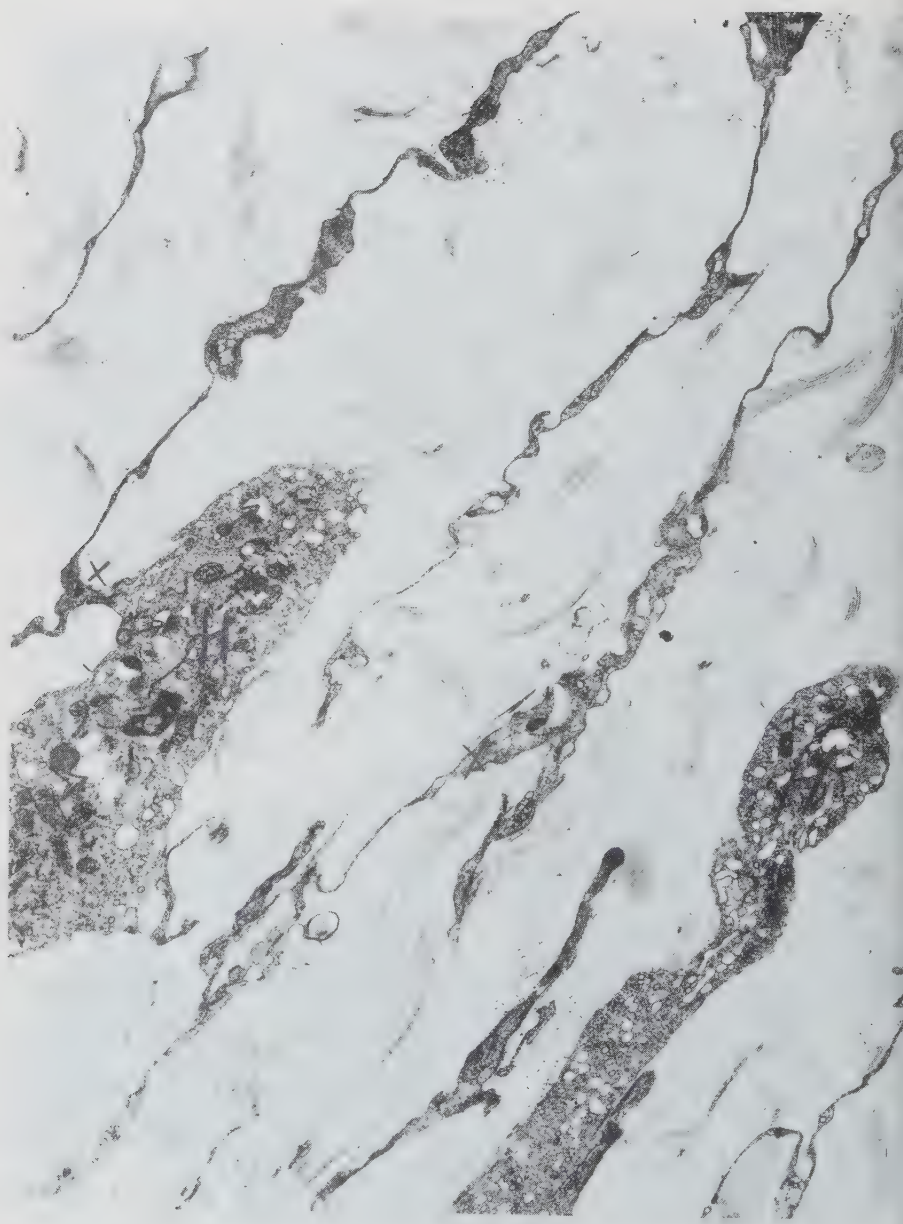
Vergr.: 21 000

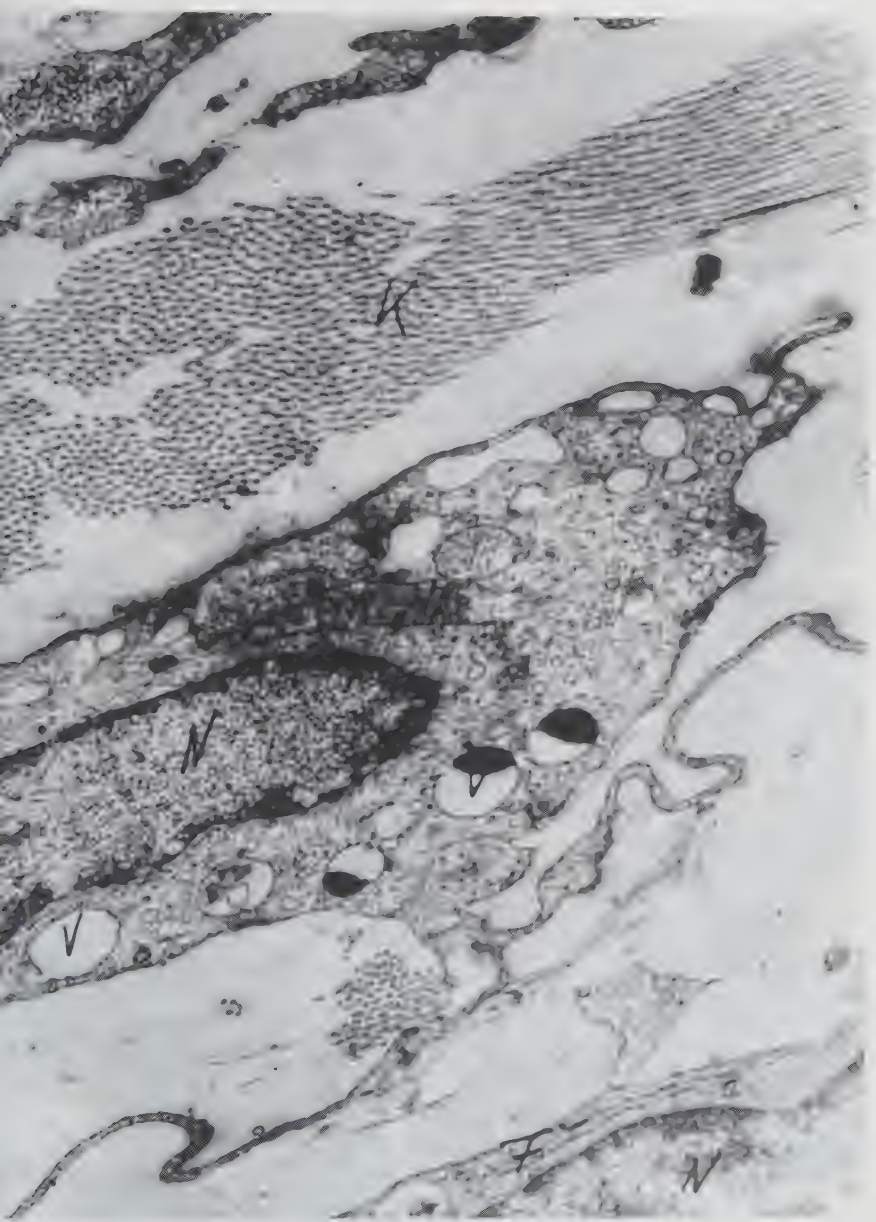
Abb.9 Verteilungskurve der Fibrillendicken. Ordinate: Anzahl der ausgezählten Fibrillen, Abszisse: Dicke der ausgezählten Fibrillen .

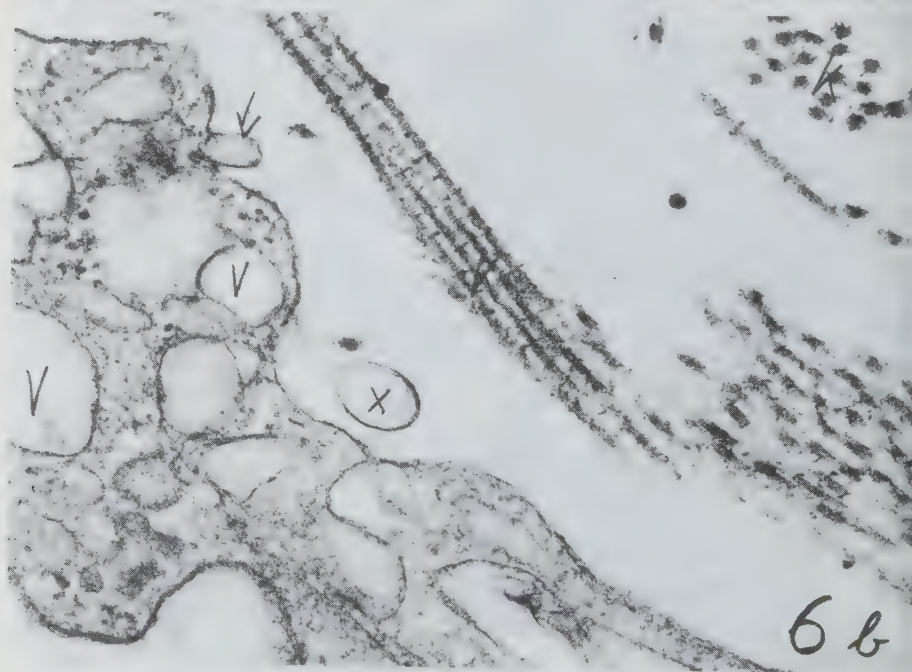
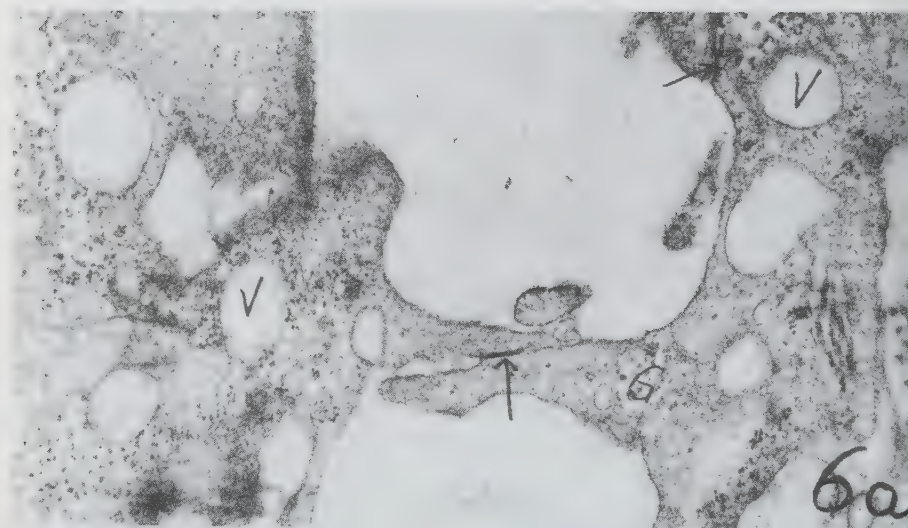


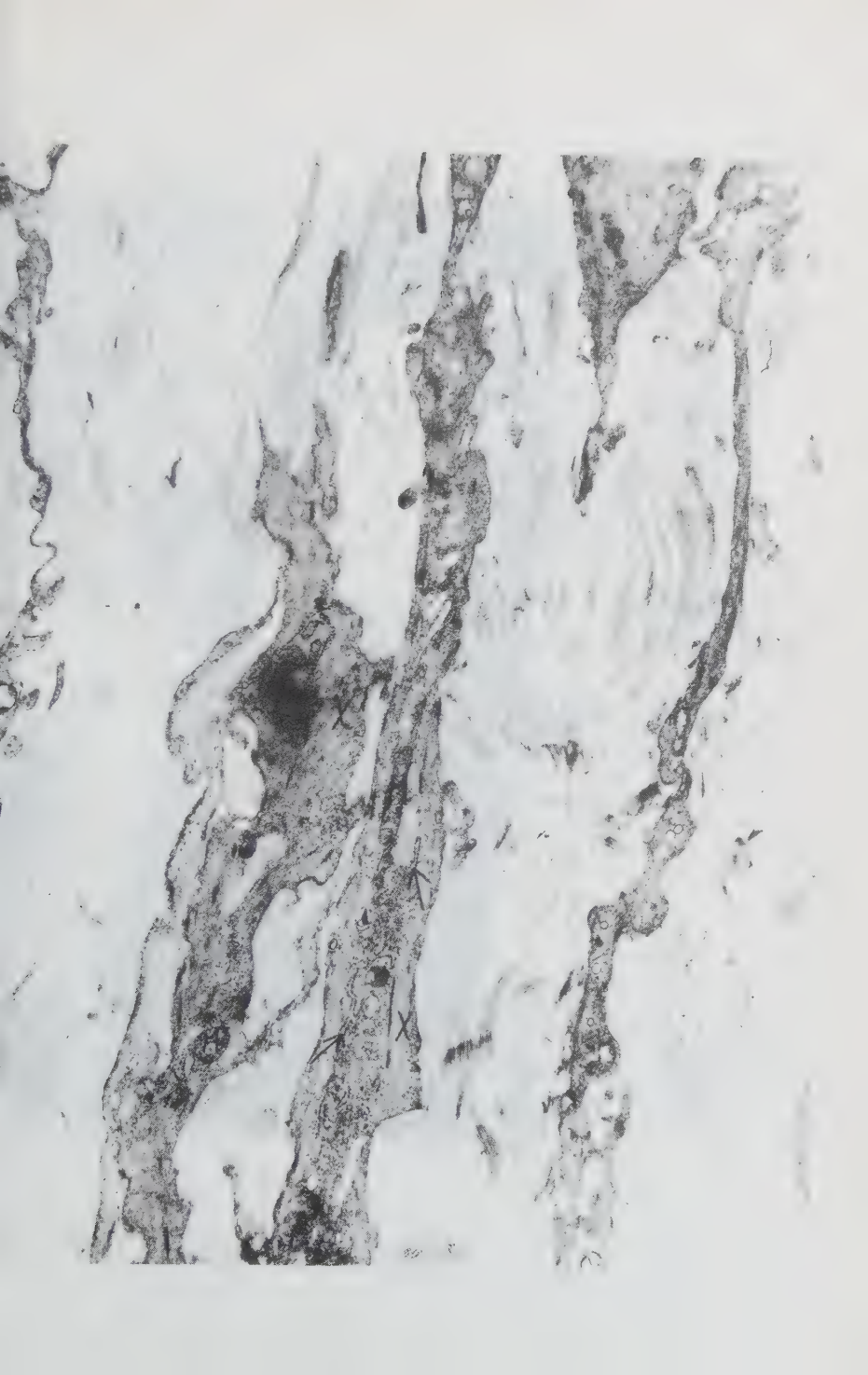


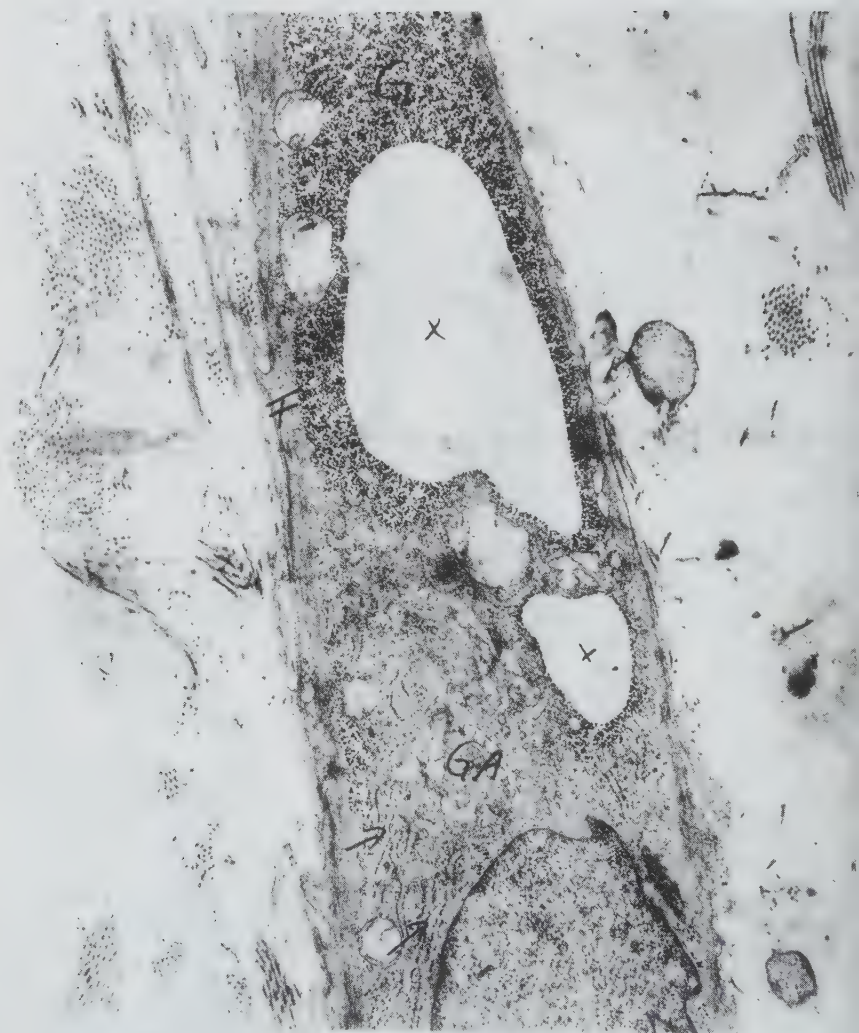






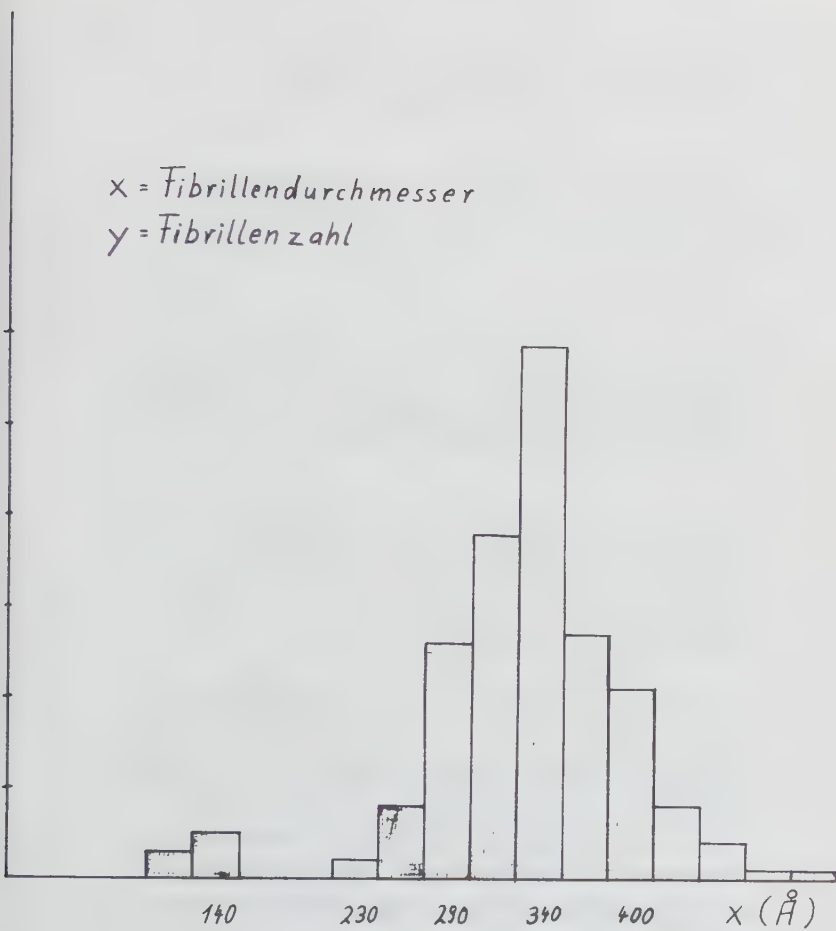






x = Fibrillendurchmesser

y = Fibrillenzahl



Literaturverzeichnis

- 1.) Blümcke, S.; Rode, J.; Niedorf, H.R.: Formation of the basement membrane during regeneration of the corneal epithelium. - Z.Zellforsch. 93, 84-92 (1969)
- 2.) Brightman, M.W.; Reese, T.S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. - J. Cell Biol. 40, 648-677 (1969)
- 3.) Chapman, J.A.: Morphological and chemical studies of collagen formation. In: The fine structure of guinea pig granulomata. - J. biophys. biochem. Cytol. 9, 639-651 (1961)
- 4.) Güldner, F.-H., Wolff, J.R.: Distribution of contractile elements and porous segments of capillaries within duodenal villi.-VI Conf. on Microcirculation, Aalborg (Dänemark), Vortrag Karger Basel (im Druck)
- 5.) Grassmann, W.: Kollagen. In: L.Zechmeister: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 23, 195-293 Springer Verl. Berlin und New York (1965)
- 6.) Hammersen, F.: Anatomie der terminalen Strombahn. - Urban & Schwarzenberg, München-Berlin - Wien (1971)
- 7.) Highton, T.C., Myers, D.B., Rayns, D.G.: Zit. bei Myers et al. (1969)
- 8.) Hurych, H.E.; Nordwig, A.: Biosynthese des Kollagens. Leder 16, 60 (1965)

- 9.) Karrer, H.E.: Electron microscope study of developing chick embryo aorta. - J. Ultrastructure Res. 4, 420-454 (1960)
- 10.) Loewenstein, W.R.; Kanno, Y.: Studies on epithelial junction. In: Modifications of surface membrane permeability. - J. Cell Biol. 22, 565-586 (1964)
- 11.) Lowther, D.A. (1968): Zit. bei Myers et al. (1969)
- 12.) Luft, J.H.: Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myotendineal junction.-6. Int. Congr. EM, Kyoto, 65-66 (1966)
- 13.) Luft, J.H.: Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red fixative and staining. - J. Cell Biol. 23, 54A-55A (1964)
- 14.) _____: The fine structure of hyaline cartilage matrix following ruthenium red fixative and staining. - J. Cell Biol. 27, 61A (1965)
- 15.) McNutt, N.D; Weinstein, R.S.: The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze-cleave study. - J. Cell Biol. 47, 666-688 (1970)
- 16.) Merker, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. - Z. Zellforsch. 53, 411-430 (1961)
- 17.) _____: Formation of connective tissue. In: Metabolic pathways in embryonic tissues. I. Symposium des SFB 29 (1970) (im Druck)
- 18.) Moore, R.D.; Schoenberg, M.D.: Studies on connective tissue. The cytoplasm of the fibroblast. - Exp. Cell Res. 20, 511-518 (1960)
- 19.) Myers, D.B.; Highton, T.C.; Rayns, D.G.: Acid

mucopolysaccharides closely associated with collagen fibrils in normal human synovium.- J. Ultrastructure Res. 28, 203-213 (1969)

20.) Parakkal, P.F.: Role of macrophages in collagen resorption during hair growth cycle. - J. Ultrastructure Res. 29 210-217 (1969)

21.) Schwarz, W.: Über die Morphologie der verschiedenen Bindegewebsfasern unter besonderer Berücksichtigung des Kollagens. In: Beiträge zur Silikoseforschung (Sonderband Grundfragen der Silikoseforschung (K.Thomas und W.Schoedel ed.) 173-183 (1955)

22.) _____: Über Bindegewebsfibrillen im Interstitium der Lunge . Beitr. zur Silikoseforschung Sonderband II, 605-614 (1956)

23.) _____: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Whartonschen Sulze menschlicher Embryonen. Verhandlungen der Anatomischen Ges. 59. Versammlung in München (M.Watzka und H. Voss ed.) Ergänzungsheft zum 113. Band des Anatomischen Anzeigers 102-113 (1964)

24.) Schwarz, W., Güldner, F.-H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Kollagenabbaus im Uterus der Ratte nach der Schwangerschaft. - Z.Zellforsch. 83, 416-426 (1967)

25.) _____; Graf Keyserlingk, D.: Über die Feinstruktur der menschlichen Cornea, mit besonderer Berücksichtigung des Problems der Transparenz. - Z. Zellforsch. 73, 540-548 (1966)

26.) _____; Graf Keyserlingk, D.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an humanen Horn-

hauttransplantat. - Virchows Arch. Abt. A
Path. Anat. 347, 115-128 (1969)

- 27.) _____; Merker, H.J; Kutzsche, A.: Elektron-
enmikroskopische Untersuchungen über die Fi-
brillogenese in Fibroblastenkulturen. - Z.
Zellforsch. 56, 107-124 (1962)
- 28.) Sheldon, H.: Observations on the production
of matrix by bone and cartilage cells. - Proc.
of Europ. Reg. Conf. EM, Delft (Houwink and
Spit, ed.) 786-790 (1960)
- 29.) Sotelo, C.; Taxi, J.: Ultrastructural aspects
of electrotonic junctions in the spinal cord
of the frog. - Brain Res. 17, 137-141 (1970)
- 30.) Yardley, J.H.; Heaton, M.W; Gaines, L.M.;
Shulman, L.E.: Collagen formation by fibro-
blasts. - Bull. John Hopkins Hosp. 106, 381-
393 (1960)

Für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Beratung bin ich Herrn Prof. Dr. med. Willy Schwarz zu großem Dank verpflichtet. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Fritz-H. Güldner, der mir sowohl beim experimentellen Teil als auch bei der sonstigen Durchführung der Arbeit eine große Hilfe war. Ferner bedanke ich mich bei Frau Sybilla Shunnar für die vorzügliche technische Hilfe.

Lebenslauf

Am 6. Januar 1941 wurde ich als zweites Kind des Arztes Dr. med. W. Kallweit und seiner Ehefrau Käte, geb. Wittke in Bartenstein geboren. 1944 verließ ich meine Heimat Ostpreußen und lebe seit 1945 in Berlin. 1947 erfolgte meine Einschulung, 1960 bestand ich am Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau das Abitur. Im Mai 1960 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Medizinstudium, bestand im April 1961 das Vorphysikum und im Oktober 1962 die Ärztliche Vorprüfung. Nach 6 klinischen Semestern - wiederum an der FU-Berlin - bestand ich im April 1966 die Ärztliche Prüfung mit "gut". Nach der Medizinalassistentenzeit wurde mir im September 1968 die Bestallung als Arzt erteilt. Als Assistenzarzt arbeitete ich im Städt. Kinderkrankenhaus Charlottenburg, im Krankenhaus der Berliner Vollzugsanstalten, und in der Allgemeinpraxis meines Vaters, die ich vor kurzer Zeit übernommen habe. Seit 1967 bin ich verheiratet und habe 2 Kinder.



